BULLETIN DU MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE
3e série, no 201, novembre-décembre 1973, Botanique 14

Mise en place de la silice dans les cellules épidermiques de la feuille d'une Ptéridophyte : *Selaginella kraussiana*

II. Étude ultrastructurale

par D. Robert, J. Laroche, C. Guervin, C. Le Coq et A. Sauvanet *

Résumé. — Après les observations morphologiques, cytochimiques et cytophysiques ayant constitué le thème d'un article précédent, nous avons poursuivi des recherches en microscopie électronique par transmission afin de préciser les modalités de dépôt de la silice dans les parois externes des cellules épidermiques de la feuille de *Selaginella kraussiana*. Au niveau des ornementations, « dents » et « verrues », nous avons mis en évidence des relations étroites existant entre l'évolution du protoplasme et celle consécutive de la paroi. Cette relation caractérise la première phase de silicification des idioblastes. La seconde phase de minéralisation, qui affecte tout l'épiderme, est conforme à celle qui est rencontrée chez de nombreuses autres espèces.

Abstract. — Following the morphological, cytochemical and cytophysical observations which have been the object of a previous paper, we continued with our research in electronic microscopy by transmission in order to specify the modality of the settling of silica in the external walls of the epidermal cells on the leaf of *Selaginella kraussiana*. As regards ornamentations " dents " and " verrues ", we have made evident the close relations existing between the evolution of the protoplasma and the consecutive evolution of the wall. This relation characterizes the first phase of mineralisation in idioblasts. The second phase of silicification which concerns the whole epiderm is similar to the one which appears in several other species.

Dans une publication précédente [**14**] nous avons rendu compte de la distribution de la silice sur le limbe foliaire de *Selaginella kraussiana*, décrit les stades successifs de la mise en place de ce dépôt minéral et insisté sur le fait que la silice, quoique tapissant la totalité de la surface foliaire, présente des sites préférentiels de dépôt dans les portions marginales au niveau de « verrues » et de « dents ». Chez ces verrues et dents, primitivement callosiques, nous avons, par des techniques cytochimique et cytophysique, suivi la substitution progressive de la silice à la callose.

Nous rapportons dans cette note les résultats d'études entreprises, en microscopie

* C. Le Coq, C. Guervin, *Muséum national d'Histoire naturelle, Laboratoire de Biologie végétale appliquée, 61, rue de Buffon, 75005 Paris.*

D. Robert, J. Laroche, A. Sauvanet, *Faculté des Sciences, Laboratoire de Biologie végétale, 12, rue Cuvier, 75005 Paris.*

électronique par transmission, sur les processus de silicification des cellules épidermiques et plus particulièrement de celles porteuses de verrues et de dents.

Matériel et techniques

Sur des individus de *S. kraussiana* ont été prélevées des microphylles situées dans le bourgeon et le long de la tige.

Pour les investigations en microscopie électronique par transmission, les feuilles furent fixées :

— soit au tétroxyde d'osmium à 1 % dans le tampon selon Palade (pH = 7,2) ;

— soit au glutaraldéhyde dans le tampon cacodylate de sodium (pH = 7,2) et post-fixées au tétroxyde d'osmium dans le même tampon.

Dans les deux cas, les échantillons, après déshydratation par l'éthanol et imprégnation par l'oxyde de propylène, ont été progressivement inclus dans l'Epon, milieu d'inclusion particulièrement favorable en raison de la possibilité qu'il offre d' « adapter » son degré de dureté à celui de l'échantillon. Les coupes ultra-fines, obtenues avec un microtome Reichert OMU 2, ont été contrastées par l'acétate d'uranyle puis le citrate de plomb selon Venable et Goggeshall [**28**].

Afin de vérifier que certains éléments opaques aux électrons correspondaient bien à de la silice et non à des dépôts de métaux lourds, des spécimens témoins furent soumis au seul traitement prolongé de fixation par le glutaraldéhyde et observés sans contrastant.

Les observations ont été effectuées à l'aide d'un microscope électronique Siemens Elmiskop I.

Résultats

Alors que sur la face foliaire adaxiale plusieurs types de dépôts siliceux coexistent, sur la face adaxiale il ne s'en trouve qu'un seul. Une discrimination s'impose entre les dents marginales, les verrues sub-marginales et le recouvrement siliceux du reste du limbe.

1. Dépôts siliceux au niveau des ornementations épidermiques de la face adaxiale

a — *Les verrues*

En raison de leur taille, de leur nombre élevé et de leur situation topographique définie, les verrues constituent un matériel très favorable à l'étude des phénomènes de silicification en microscopie électronique. Nous leur avons donc octroyé une grande importance. Chez la troisième feuille à partir de l'apex, qui correspond à l'état le plus jeune que nous avons retenu, la paroi squelettique externe (fig. 1) des cellules épidermiques porteuses de verrues se singularise déjà par la présence d'épaississements lenticulaires (fig. 1, Ca) fort importants. La paroi pecto-cellulosique (fig. 1, Pc_1), d'épaisseur constante (0,5 μ) entre ces formations, s'amincit peu à peu au point de se résoudre en une couche très fine à leur sommet (fig. 1, flèche). L'épaississement lui-même consiste en une substance d'appa-

rence homogène, très peu opaque aux électrons, la callose (fig. 1, Ca), comme les examens en fluorescence l'ont prouvé [**14**].

La callose déposée dans la paroi ne semble pas affecter la cuticule (fig. 1, Cu) dont l'aspect et l'épaisseur (0,1 μ) restent constants. Le cytoplasme, limité par un plasmalemme épousant étroitement le contour de l'épaississement, révèle un appareil vacuolaire optiquement vide constitué de plusieurs éléments (fig. 1, v) d'importance inégale.

Chez une feuille légèrement plus âgée (d'ordre 4 ou 5), chaque épaississement callosique (fig. 2, Ca), toujours ourlé d'une cuticule, s'est accru sensiblement ; il fait alors saillie à la surface. Dès lors, la morphologie définitive de la verrue est acquise. La partie pectocellulosique de la paroi (fig. 2, Pc_1) conserve les mêmes caractéristiques que précédemment ; toutefois, elle devient si ténue qu'il est difficile de la caractériser à l'apex de l'ornementation (fig. 2, flèche double). Au sein du cytoplasme, le système vacuolaire, développé en un élément unique de taille considérable (fig. 2, v), présente, dans la partie basale, de fins précipités d'aspect fibrillaire (fig. 2, Pf), agencés en une manière de réseau et ponctués, çà et là, de petits nodules opaques aux électrons (fig. 4, flèches).

A cette phase de l'évolution, le noyau et les chloroplastes ont une forme, des dimensions et une localisation en tous points semblables à celles de ces mêmes organites dans les autres cellules épidermiques. Le cytoplasme consiste en une couche pariétale par suite de l'hypertrophie vacuolaire ; il offre alors un aspect spécifique comparé à celui des cellules immédiatement contiguës (fig. 2). Il tranche en effet par sa plus grande opacité aux électrons, la dilatation bien visible de certaines nappes de son réticulum endoplasmique (fig. 3, Re), enfin son décollement de la paroi squelettique qui libère un espace libre où l'on distingue des formations vésiculaires (fig. 2, flèches simples). Doit-on voir dans ce décollement, limité à la périphérie de la lentille callosique et à la seule paroi externe, la conséquence d'un artefact ? Le fait qu'à ce stade il ne soit observable que chez les cellules se distinguant par une importante opacification du cytoplasme et une forte dilatation réticulaire semble concrétiser une activité physiologique particulière.

Par la suite, nous nous intéresserons plus spécialement aux modifications affectant la paroi et le contenu vacuolaire.

Prenons d'abord le cas d'une verrue dont l'évolution est plus avancée (fig. 5). Par comparaison avec la *précédente* (fig. 2), nous relevons trois différences essentielles :

1) Une couche néoformée d'un matériel non callosique, que ses affinités tinctoriales et son aspect apparentent à de la cellulose, est déposée entre le plasmalemme et la lentille callosique (fig. 5, Pc_2). Cette couche contribue à la régularisation du contour de la face interne de la paroi au niveau de la verrue. Il n'est pas exclu que les formations vésiculaires, précédemment signalées (fig. 2, flèche simple), soient en rapport avec cette nouvelle élaboration de paroi.

2) Un matériel granuleux et opaque aux électrons borde l'extérieur de la lentille callosique (fig. 5, flèches simples) ; il forme, à la base de cette dernière, en position immédiatement sus-jacente à la couche néoformée (fig. 5, Pc_2), deux plages marginales représentant la section d'un bourrelet annulaire (fig. 5, flèches doubles). Ce matériel correspond-il à la première forme d'expression de la silice au sein de la callose ou bien objective-t-il un remaniement des polysaccharides préludant au dépôt de silice ?

3) Les précipités vacuolaires croissent en importance ; simultanément, leur aspect fibrillaire s'estompe et les mailles du réseau qu'ils dessinaient se resserrent, deux faits qui tendent à dissimuler les nodules opaques bien visibles antérieurement. Ces précipités, initialement localisés dans la partie basale, envahissent peu à peu toute la vacuole.

Peu de temps sépare cet état du suivant (fig. 6 et 7) où les deux plages marginales bordant le dépôt callosique (fig. 6 et 7, Ca) se sont enrichies en matériel de plus en plus opaque : la silice (fig. 6 et 7, Si). A la base de l'ornementation apparaît une stratification due à une succession de stries fines plus ou moins riches en matériel opaque (fig. 7). Simultanément dans la vacuole (fig. 6 et 7, v), les précipités sont de plus en plus denses (fig. 6 et 7, Pf) ; c'est le moment où ils se raréfient dans la partie basale et se concentrent au pôle opposé contre le tonoplaste (fig. 6, flèche) qu'ils bordent bientôt d'une couche épaisse très opaque aux électrons (fig. 7). Leur aspect est encore moins fibrillaire et on ne trouve plus trace de réseau.

Au terme de leur accumulation maximale, les précipités vacuolaires disparaissent peu à peu et leur régression accompagne un complet remaniement de la lentille callosique de l'ornementation ; la substitution progressive de la silice à la callose (fig. 8 et 9) s'effectue selon une direction centripète. Ce phénomène, quoique rapide, peut être suivi aussi bien sur des sections pratiquées à niveau constant dans des feuilles d'âge croissant que sur des coupes effectuées à des niveaux de plus en plus proches de l'apex d'une feuille encore jeune.

Il en résulte bientôt (fig. 10) sous la cuticule (fig. 10, Cu), dont les caractères sont demeurés semblables, la présence d'un dépôt siliceux (fig. 10, Si) très dense et homogène, parfaitement opaque aux électrons, aucune trace de callose n'y subsistant. Dans la vacuole (fig. 10, V), les précipités ont alors pratiquement disparu et le contenu retrouve sa transparence initiale aux électrons. La rareté des images intermédiaires entre celles reflétant une forte densité de précipités au sein de la vacuole et celles où cette dernière est transparente atteste la rapidité du phénomène, rapidité qui caractérise également la substitution de la silice à la callose ; il nous paraît évident que les deux phénomènes sont en liaison étroite.

Au cours de cette dernière phase d'évolution, plusieurs faits méritent d'être soulignés à propos du cytoplasme :

— la diminution sensible de sa densité ;

— l'apparition de vésicules dont la taille croît avec le vieillissement (fig. 9 et 10, Ve) ;

— la rétraction légère, mais bien perceptible, qui ménage à nouveau un espace libre entre le plasmalemme et la paroi (fig. 10) ;

— l'existence de dépôts opaques flanquant le plasmalemme (fig. 9, flèches) ou s'accumulant au niveau de sites sans doute préférentiels (fig. 10, flèches), ces dépôts étant toujours situés à proximité immédiate de la verrue minéralisée.

La minéralisation dans les portions de paroi jouxtant le granule n'est pas commencée. Correspondant à la silicification de l'ensemble de l'épiderme, nous l'envisagerons dans le cadre de cette dernière.

b — *Les dents*

Suivons les étapes conduisant à la minéralisation du mucron et de sa cellule porteuse.

Initialement callosique (fig. 12, Ca), le mucron (fig. 12 et 13) est l'homologue de la lentille callosique d'une verrue. Dans un premier temps, la silice s'accumule dans la partie basale, puis gagne rapidement la partie terminale en constituant un fourreau à la callose (fig. 13, flèches). Elle se substitue ensuite à cette dernière selon une progression centripète pour donner naissance à une sorte d'aiguille purement minérale recouverte du manchon cuticulaire. A la taille et à la forme près, le mucron présente donc un comportement en tous points similaire à celui d'une verrue.

La cellule porteuse (fig. 11) est de grande taille et peut atteindre, voire dépasser, 40 μ de longueur. Noyau et choloroplastes sont situés dans la portion la plus basale ; le cytoplasme, réduit à une couche périphérique riche en organites (fig. 13, m et g), est creusé d'une importante vacuole axiale (fig. 11, v). Dans cette dernière, très tôt, comme dans les cellules porteuses de verrues, des précipités opaques aux électrons (fig. 11, Pf) peuvent être observés. Pendant la silicification du mucron, la paroi squelettique conserve une épaisseur sensiblement égale et constante (0,6 à 0,7 μ) et l'on n'y relève jamais l'existence de dépôt callosique.

Lorsque la minéralisation du mucron est achevée, on est frappé par la grande similitude d'aspect du cytoplasme de ces cellules avec celui des cellules porteuses de verrues minéralisées, notamment la localisation de plages opaques aux électrons.

2. **Silicification générale de l'épiderme**

Le début de cette phase suit la fin de la minéralisation des mucrons et des verrues. Les cellules porteuses de ces formations sont concernées par ce phénomène au même titre que les autres.

Son déroulement est progressif et l'examen d'un cliché tel que celui de la figure 14 permet d'en saisir le mécanisme. Dans la paroi, on assiste à une opacification des dépôts depuis la région voisine du plasmalemme (fig. 14, Pl) jusqu'à la zone sous-cuticulaire ; ainsi, on suit un gradient croissant de silicium (fig. 14, Si). Cette observation indique que le matériel opaque, dispersé à proximité du cytoplasme, se condense peu à peu au cours de sa migration au sein de la paroi. A aucun moment, le système vacuolaire (fig. 14, v) ne révèle de précipités semblables à ceux qui caractérisaient le début de la minéralisation des mucrons et des verrues chez les idioblastes.

Cette imprégnation diffère donc de celle rencontrée au niveau des verrues et des mucrons. A la succession callose-silice s'oppose ici le dépôt direct du minéral. Cette silicification très lente conduit à la formation d'un encroûtement continu, homogène, d'épaisseur constante sauf dans les zones de séparation de deux cellules contiguës où il est nettement plus important (fig. 16, flèche simple). L'accumulation minérale se poursuivant, cet encroûtement deviendra essentiellement sous-cuticulaire et constituera ainsi une carapace séparée du cytoplasme par la partie de la paroi cellulosique qui est peu ou pas minéralisée. Il affecte toutes les cellules épidermiques des deux faces foliaires, à l'exception de celles porteuses de mucrons et de verrues (fig. 15) chez lesquelles il se produit sous les dépôts de silice antérieurement mis en place (fig. 15, C_2).

De plus, les cellules porteuses de mucron se singularisent :

— par le fait que cette phase de minéralisation générale débute antérieurement à celle qui a lieu chez les autres cellules épidermiques ;

— par l'inégale répartition de l'élément silicium, la face orientée vers l'extérieur de la feuille étant fortement encroûtée, celle tournée vers le limbe n'en présentant qu'une fine pellicule, enserrée entre la cuticule et la paroi cellulosique (fig. 17 et 19).

La face interne de la feuille (fig. 20, In) diffère de l'externe (fig. 20, Ex) par la présence d'épaississements cuticulaires (fig. 20, flèches) : mamelons observés sur le limbe. A leur niveau (fig. 18), la couche opaque aux électrons (fig. 18, flèche simple), séparant la cuticule (fig. 18, Cu) de la paroi cellulosique, tresse un réseau (fig. 18, flèche double). Dans les mailles de ce dernier, à ce moment-là, se trouve une substance d'aspect rappelant celui de la cutine ; cette substance ne réagit pas au test de Thierry [**27**]. Après la dernière phase de minéralisation (fig. 16, flèche double), ces mamelons, demeurés d'opacité constante, apparaissent relativement clairs à l'exemple de la cuticule et tranchent sur le fond siliceux totalement noir.

Discussion

Cette étude, limitée aux organes foliaires de *Selaginella kraussiana*, a révélé que seule la paroi externe des cellules épidermiques recélait un dépôt siliceux.

Deux types de cellules épidermiques, localisés dans la partie marginale de la feuille, se distinguent des autres par la présence d'excroissances de forme caractéristique que nous avons nommées, après Waterkeyn et Bienfait [**29**], verrues et dents. Ces ornementations, très vite silicifiées, sont portées par des cellules particulières ou idioblastes.

Dans ces cellules spécialisées, à un premier temps de silicification qui leur est spécifique, succède un second qui, lui, affecte de plus la totalité de l'épiderme.

La silicification chez les plantes est complexe et difficile à suivre, d'une part en raison de la rapidité de son déroulement, d'autre part à cause de son intensité souvent excessive, faits s'opposant à l'application des techniques habituelles. *S. kraussiana* présente le double avantage de posséder des dépôts relativement modestes et d'échelonner sa minéralisation sur un assez long laps de temps. Ces particularités nous ont permis chez les idioblastes de définir cinq phases essentielles avant l'acquisition de l'état définitif de la paroi externe, en précisant toutefois que les quatre premières n'intéressent que leurs ornementations ; on suit par ordre chronologique :

1. une phase pecto-cellulosique ;

2. une phase callosique à la fin de laquelle la morphologie définitive des ornementations est acquise ; déjà mentionnée par Waterkeyn et Bienfait [**29**], elle est très particulière aux idioblastes et constitue, à notre connaissance, un fait original dans le monde végétal [**14**] ;

3. une phase cellulosique entraînant l'isolement de la callose ;

4. une phase de silicification, fort longue et complexe, se subdivisant en deux périodes de durée inégale : la première, où commence la mise en place des éléments minéraux en bordure immédiate de la lentille callosique des verrues et des mucrons des dents, nettement

plus longue que la seconde où l'on assiste à la substitution progressive de la silice à la callose dans ces ornementations ;

5. une nouvelle phase de silicification mais affectant, cette fois, l'ensemble de la paroi au niveau des couches cellulosiques.

La silicification n'est pas simultanée pour tous les idioblastes d'une même feuille. A l'exemple des Graminées, elle débute à l'apex et gagne graduellement les cellules situées en position de plus en plus basale. Une telle progression basipète résulte du mode de développement de la feuille dont la croissance par mérèse s'effectue grâce à l'intense activité cellulaire localisée dans la zone basale [**14**] ; elle « reflète bien le gradient de sénescence basipète » défini par Sangster et Parry [**24**].

Chez la totalité des autres cellules épidermiques, l'évolution se limite à deux temps : l'un de formation d'une couche pecto-cellulosique, l'autre de minéralisation identique et simultanée à la cinquième phase rencontrée chez les idioblastes ; les parois externes sont seules intéressées, ce qui distingue cette espèce d'autres Ptéridophytes telle *Equisetum hyemale* chez qui Kaufman *et al.* [**12**] ont également signalé la présence de ce minéral sur les parois radiales.

Ceci rappelle chez cette plante ce que Sangster [**22, 23**] a rapporté chez les Graminées : les premiers dépôts siliceux des feuilles sont repérables précocement à l'intérieur de grandes cellules spécialisées dans l'élaboration de dépôt, cellules toujours situées à proximité immédiate du système xylémien.

Chez *S. kraussiana*, le début de minéralisation coïncide avec la fin de l'élaboration du matériel organique de la paroi squelettique [**14**] ; de même Frey-Wissling et Mühlethaler [**8**], ainsi que Mehra et Sharma [**17**], ont relevé que les dépôts siliceux sont différés jusqu'à l'achèvement des dépôts cellulosiques.

L'existence de deux phases de minéralisation objective celle de deux types d'activité physiologique consécutifs et différents au sein d'une même catégorie de cellule. En cela, cette plante se rapproche des Graminées chez lesquelles Blackman et Parry [**2**] ont remarqué que les dépôts sous forme atypique n'ont pas lieu en même temps et résultent d'un mécanisme totalement différent de celui qui caractérise les idioblastes.

Est-il possible de lever certaines incertitudes qui entourent le mode de migration de la silice au sein de la cellule épidermique et de comprendre les processus de traversée de la paroi pecto-cellulosique ? Jusqu'ici, en effet, les hypothèses déduites d'observations précises n'ont pas fourni de réponse définitive à cette double question car les modalités de l'excrétion siliceuse varient apparemment d'un groupe à un autre, d'un organisme à un autre du même groupe, voire d'une cellule à une autre d'un même organisme tel que cela se produit d'ailleurs chez *S. kraussiana*.

Prenons l'exemple des Graminées. La silice est déposée entre la paroi squelettique et le plasmalemme des cellules épidermiques banales [**5**] ou au sein même de certaines cellules épidermiques vidées de leur protoplasme [**1**]. Les conceptions émises par Drum [**5**] et Blackman [**1**] divergent d'ailleurs sur le problème de la vitalité des cellules spécialisées dans l'excrétion siliceuse : alors que le premier lie excrétion et cellule vivante, c'est-à-dire qu'il admet le principe d'un phénomène actif, le second assure qu'une dégénérescence totale précède toujours le dépôt. Cette sénescence précoce des idioblastes est attribuée à une déficience en auxine par Osborne [**19**].

Chez les idioblastes de *S. kraussiana*, le dépôt est élaboré par des cellules bien vivantes.

Deux aspects cytologiques différents délimitent la phase active d'excrétion. Le premier, correspondant à l'apparition de précipités vacuolaires, est marqué par une opacification du cytoplasme, une importante dilatation des nappes du réticulum endoplasmique et une légère rétraction cytoplasmique. Le second se situant à la fin de la première phase de l'excrétion minérale, c'est-à-dire lorsque le contenu vacuolaire paraît optiquement vide, est caractérisé par une nouvelle rétraction, la formation de vésicules au sein du cytoplasme et la présence de composés opaques, soit au sein de ce dernier, soit à l'extérieur du plasmalemme. Hors de cette phase d'activité au cours de laquelle se réalise la minéralisation des ornementations, rien, au niveau du cytoplasme, ne permet d'établir une discrimination entre les idioblastes et les autres cellules de l'épiderme. Les cellules d'une telle espèce fournissent-elles des renseignements sur le mode d'excrétion ? La microscopie électronique par transmission a permis d'établir que l'apparition de fibrilles vacuolaires préludait à la minéralisation de la paroi. Celles-ci sont au début peu nombreuses et localisées au pôle basal ; leur nombre croît ensuite et elles occupent progressivement la totalité du contenu vacuolaire ; puis, elles se concentrent en une masse dense contre la portion du tonoplaste tournée vers l'ornementation ; enfin, elles disparaissent. Cette observation se superpose à une autre effectuée au niveau de la paroi où les dépôts minéraux gagnent en importance, concomitamment à la disparition des précipités au sein de la vacuole. Il est manifeste qu'une relation étroite existe entre les dépôts dans la paroi et les précipités vacuolaires.

Quel est ou quels sont les termes de passage entre la vacuole et la paroi ? Faut-il voir dans les granules très denses aux électrons, présents dans le cytoplasme à des stades très précis de l'excrétion (fig. 7, flèches), la matérialisation de la forme de transport de ce minéral ? Ces formations ne présentent aucun caractère permettant de les assimiler à celles décrites par Reimann [**20**] chez les Diatomées ; selon cet auteur, la silice de ces Algues serait enfermée dans de petites vésicules bordées par une membrane organique, très comparable aux membranes plasmiques, que Coombs et Volcani [**3**] appellent silicalemme. L'origine de cette membrane de bordure n'est pas élucidée : est-elle golgienne [**20**] ou provient-elle du plasmalemme [**21**] ? Chez les Plantes Supérieures, Lewin et Reimann [**16**] estiment que les éléments siliceux pourraient, à l'exemple de ce qui a été décrit chez les Diatomées, être véhiculés dans de petites vésicules intracytoplasmiques, limitées par un « silicalemme », avant d'être expulsées à l'extérieur.

Peut-on définir des liens étroits entre le silicium et certains composés organiques ? On sait par exemple que, chez les Éponges siliceuses, les spicules seraient élaborées à l'extérieur d'une matrice organique polysaccharidique selon Drum [**6**], plus certainement protidique [**9**, **15**, **25**, **26**] ; on sait encore que les calculs rénaux du Mouton ne sont élaborés qu'en présence de protides [**18**] et que les dépôts chez les Plantes Supérieures ont lieu sur une trame glucidique.

Chez cette Ptéridophyte, le stockage du silicium s'effectuerait sur une trame polysaccharidique, soit la callose ou ses produits de dégradation, soit la cellulose, s'apparentant par là à ce qui se produit chez les Plantes Supérieures. Aussi, en dépit de la similitude du produit déposé, des substances différentes semblent conditionner le phénomène de minéralisation, laissant ainsi supposer que, contrairement à ce que suggèrent Lewin et Reimann [**16**], les mécanismes d'excrétion sont dissemblables.

Au point de vue biologique, le schème qui suit, bien que spéculatif en partie, rend

compte du cheminement du silicium chez *S. kraussiana*. Véhiculé dans la sève brute à l'état de silicate soluble, il traverserait le plasmalemme du pôle basal de la cellule, puis, parvenu dans la vacuole, s'associerait probablement avec des protéines pour former des complexes concrétisés, lors de la fixation, par les précipités fibrillaires ; de là, il passerait à nouveau dans le cytoplasme et, après la traversée du plasmalemme du pôle cellulaire apical, serait stocké dans la paroi sur une trame polysaccharidique. Selon nous, seul le passage à travers la paroi externe serait de type passif, lié au courant d'évaporation, donc au flux d'eau. Notre conclusion ainsi formulée se rapproche de celles présentées par Frey-Wyssling [**7**] et Blackman [**1**] et s'éloigne du schème de Reimann, Lewin et Volcani [**21**].

Du point de vue chimique, les étapes conduisant à la condensation du minéral pourraient être identiques à celles que Blackman [**1**] et l'un de nous [**13**] ont énoncées pour d'autres plantes. Elles consisteraient en la succession :

$$\text{Solution d'acide silicique} \rightarrow \text{sol} \rightarrow \text{gel.}$$

Le passage de l'état de solution vraie à celui de sol peut être dû à un simple abaissement de la valeur du pH et non à des réactions de type enzymatique [**10**]. Iler [**11**] obtient un tel résultat *in vitro* ; mais, c'est à Sangster [**22, 23**] que revient le mérite d'avoir montré que les acides aminés, aussi bien que les autres substances organiques colloïdales, peuvent précipiter les solutions d'acide silicique. La présence des formations fibrillaires au sein de la vacuole, caractéristiques de la phase chez les idioblastes de *S. kraussiana*, semble en accord avec ces faits. La transformation du sol en gel serait de type purement physique et consisterait en une déshydratation d'autant plus poussée que l'on s'adresserait à des strates plus périphériques.

Ce travail a montré que la silicification chez une Ptéridophyte, *Selaginella kraussiana*, qui n'était pas renommée jusqu'ici pour sa richesse en silice, résulterait de mécanismes complexes, progressifs et s'étalant sur un temps assez long. Il débouche sur certains problèmes biologiques que nous nous attachons dès maintenant à résoudre : mise en place des dépôts callosiques précédant la minéralisation, lien existant entre les phénomènes de transpiration et la silicification, signification et rôle métabolique du silicium chez cette plante.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Blackman, E., 1969. — Observations on the development of the silica cells of the leaf sheath of wheat (*Triticum aestivum*). *Can. J. Bot.*, **47** : 827-838.

2. Blackman, E., et D. V. Parry, 1968. — Opaline silica deposition in rye (*Secale cereale* L.). *Ann. Bot.*, **32** : 199-206.

3. Coombs, J., et B. E. Volcani, 1968. — Studies on the biochemistry and fine structure of silica-shell formation in Diatoms. Chemical silicon induced by metabolic transients in *Navicula pelliculosa*. *Planta*, Berlin, **80** : 264-279.

4. Coombs, J., et B. E. Volcani, 1968. — Studies on the biochemistry and fine structure of silica-shell formation in Diatoms-Chemical changes in the wall of *Navicula pelliculosa* during its formation. *Planta*, Berlin, **82** : 280-292.

5. Drum, R. W., 1968. — Electron microscopy of opaline phytoliths in *Phragmites* and other Graminae. *Am. J. Bot.*, **55** : 713.

6. — 1968. — Electron microscopy of siliceous spicules from the freshwater sponge *Heteromyenia*. *J. Ultrastruct. Res.*, **22** : 12-21.

7. Frey-Wyssling, A., 1930. — Über die Ausscheidung der Kielselsäure in den Pflanzen. *Ber. dt. bot. Ges.*, **48** : 179-183.

8. Frey-Wyssling, A., et K. Mühlethaler, 1965. — Ultrastructural plant cytology. 377 p., Elsevier Publ., Amsterdam.

9. Garrone, R., 1969. — Collagène, spongine et squelette minéral chez l'éponge *Haliclona rosea* (O. S.). *J. Microsc.*, **8** : 581-598.

10. Holt, P., 1956. — Pneumoconiensis, 268 p., Edward Arnold Ed., London.

11. Iler, R. K., 1955. — The colloid chemistry of silica and silicates. 310 p., Cornell Univ. Press, Ithaca New-York.

12. Kaufman, P. B., W. C. Bigelow, R. Schmid et N. S. Ghoshen, 1971. — Electron microprobe analysis of silica in epidermal cells of *Equisetum*. *Am. J. Bot.*, **58** : 309-316.

13. Laroche, J., 1968. — Contribution à l'étude de l'*Equisetum arvense* L. III — Recherches sur la nature et la localisation de la silice chez le sporophyte. *Revue gén. Bot.*, **75** : 65-115.

14. Le Coq, C., C. Guervin, J. Laroche et D. Robert, 1973. — Mise en place de la silice dans les cellules épidermiques de la feuille d'une Ptéridophyte : *Selaginella kraussiana*. I. Données fournies par la microscopie électronique à balayage, la microscopie de fluorescence et la microanalyse par sonde électronique. *Bull. Mus. natn. Hist. nat., Paris*, 3e sér., no 200, Botanique 13 : 185-208.

15. Levi, C., 1963. — Scléroblastes et spiculogenèse chez une éponge siliceuse. *C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris*, **256** : 497-498.

16. Lewin, J. C., et B. E. F. Reimann, 1969. — Silicon and plant growth. *A. Rev. Pl. Physiol.*, **20** : 289-304.

17. Mehra, P., et O. Sharma, 1965. — Epidermal silica cells in the cyperaceae. *Bot. Gaz.*, **126** : 53-58.

18. Nottle, M., 1966. — Diurnal and daily changes in the excretion of urinary silica by Merino sheep. *Aus. J. agr. Res.*, **17** : 183-189.

19. Osborne, D., 1963. — Hormonal control of plant death. *Discovery*, **1** : 31-35.

20. Reimann, B. E. F., 1964. — Deposition of silica inside a diatom cell. *Expl. Cell Res.*, **34** : 605-608.

21. Reimann, B. E. F., J. C. Lewin et B. E. Volcani, 1966. — Studies on the biochemistry and fine structure of silica shell formation in Diatoms. II. The structure of the cell wall of *Navicula pelliculosa* (Bréb.) Hilse. *J. Phycol.*, **2** : 74-84.

22. Sangster, A. G., 1970. — Intracellular silica deposition in immature leaves in three species of the Gramineae. *Ann. Bot.*, **34** : 245-257.

23. — 1970. — Intracellular silica deposition in mature and senescent leaves of *Sieglingia decumbens* L. (Bernh.). *Ann. Bot.*, **34** : 557-570.

24. Sangster, A. G., et D. W. Parry, 1969. — Some factors in relation to bulliform cell silicification in the grass leaf. *Ann. Bot.*, **33** : 315-323.

25. Schwab, D. W., et R. E. Shore, 1971. — Fine structure and composition of siliceous sponge spicule. *Biol. Bull.*, **140** : 125-136.

26. Schwab, D. W., et R. E. Shore, 1971. — Mechanism of internal stratification of siliceous sponge spicules. *Nature*, **232** : 501-502.

27. Thiery, J. P., 1967. — Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microsc.*, Paris, **6** : 987-1018.

28. VENABLE, J. H., et R. COGGESHALL, 1965. — Simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. biophys. biochem. Cytol.*, **25** : 407-408.

29. WATERKEYN, L., et A. BIENFAIT, 1967. — Les émergences callosiques et silicifiées des feuilles de Sélaginelles. *C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris*, **264** : 1608-1611.

Manuscrit déposé le 25 septembre 1973.

PLANCHE I

Fig. 1. — Coupe longitudinale d'une cellule porteuse de verrues. Lentilles callosiques (Ca) disposées sous la cuticule (Cu). Noter la réduction progressive de la paroi pecto-cellulosique (Pc_1) au niveau des épaississements. Dans le cytoplasme, présence de nombreuses vacuoles (v) de taille inégale (G × 21500).

Fig. 2. — Coupe transversale d'une cellule porteuse de verrues. Stade callosique plus avancé, caractérisé par la présence d'une vacuole unique et volumineuse (v).

L'épaississement callosique (Ca), bien reconnaissable sous la paroi pecto-cellulosique (Pc_1), atteint son développement maximum et donne à la verrue sa morphologie définitive. On remarque : une rétraction du protoplasme particulièrement importante dans les parties marginales du dépôt callosique (flèches simples), une opacification du cytoplasme et simultanément une dilatation de certaines nappes du réticulum endoplasmique (Re), enfin l'apparition au sein de la vacuole de précipités fibrillaires (Pf) ; ces faits différencient ce type cellulaire épidermique des autres. La double flèche indique la réduction de Pc_1 dans la partie apicale de la verrue (G × 8000).

Fig. 3. — Détail de la dilatation d'une nappe du réticulum endoplasmique (Re) (G × 14000).

Fig. 4. — Détail des précipités vacuolaires ; noter la présence de petits nodules opaques aux électrons (flèches) sur le fin réseau de fibrilles (G × 14000).

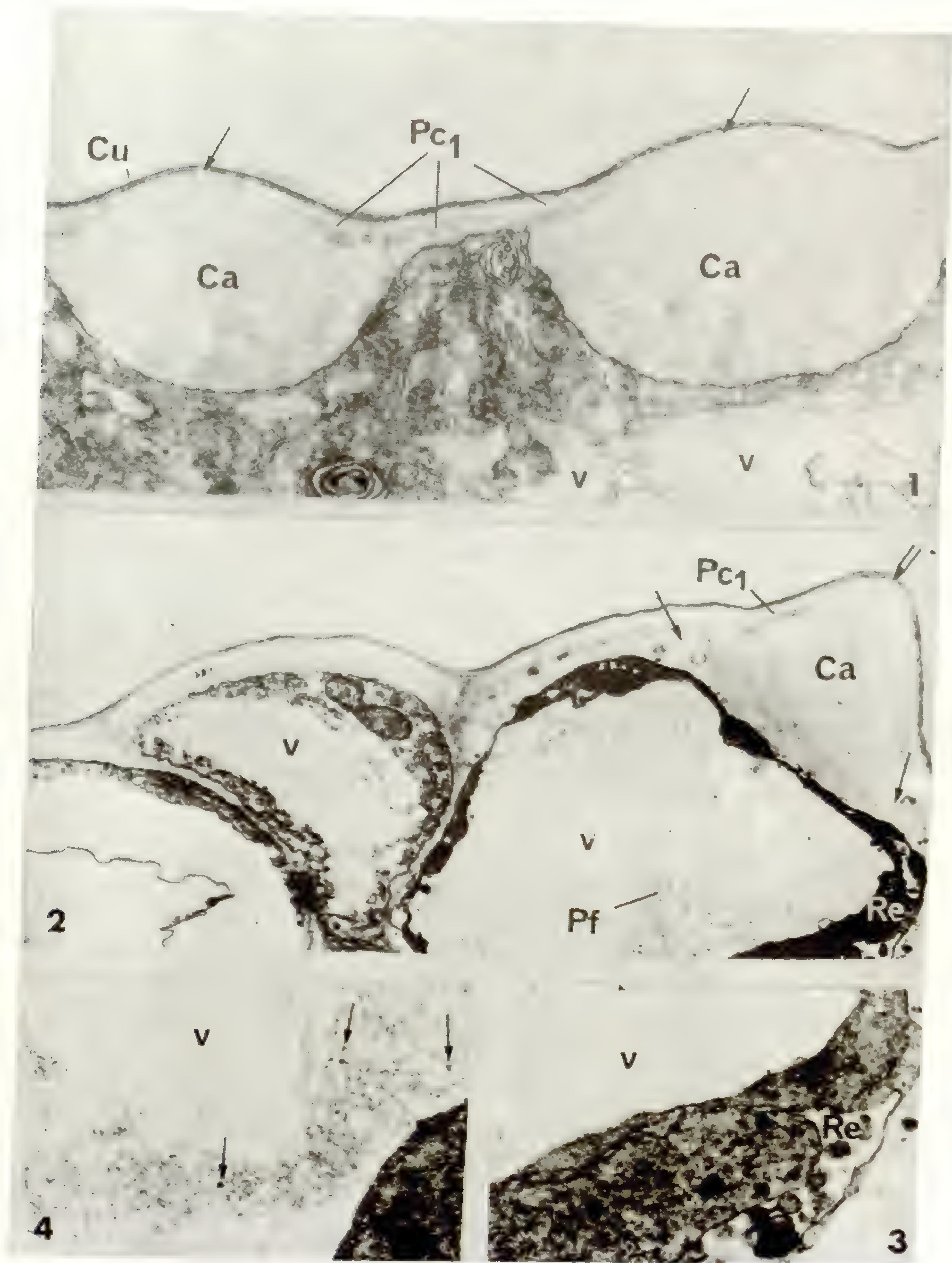


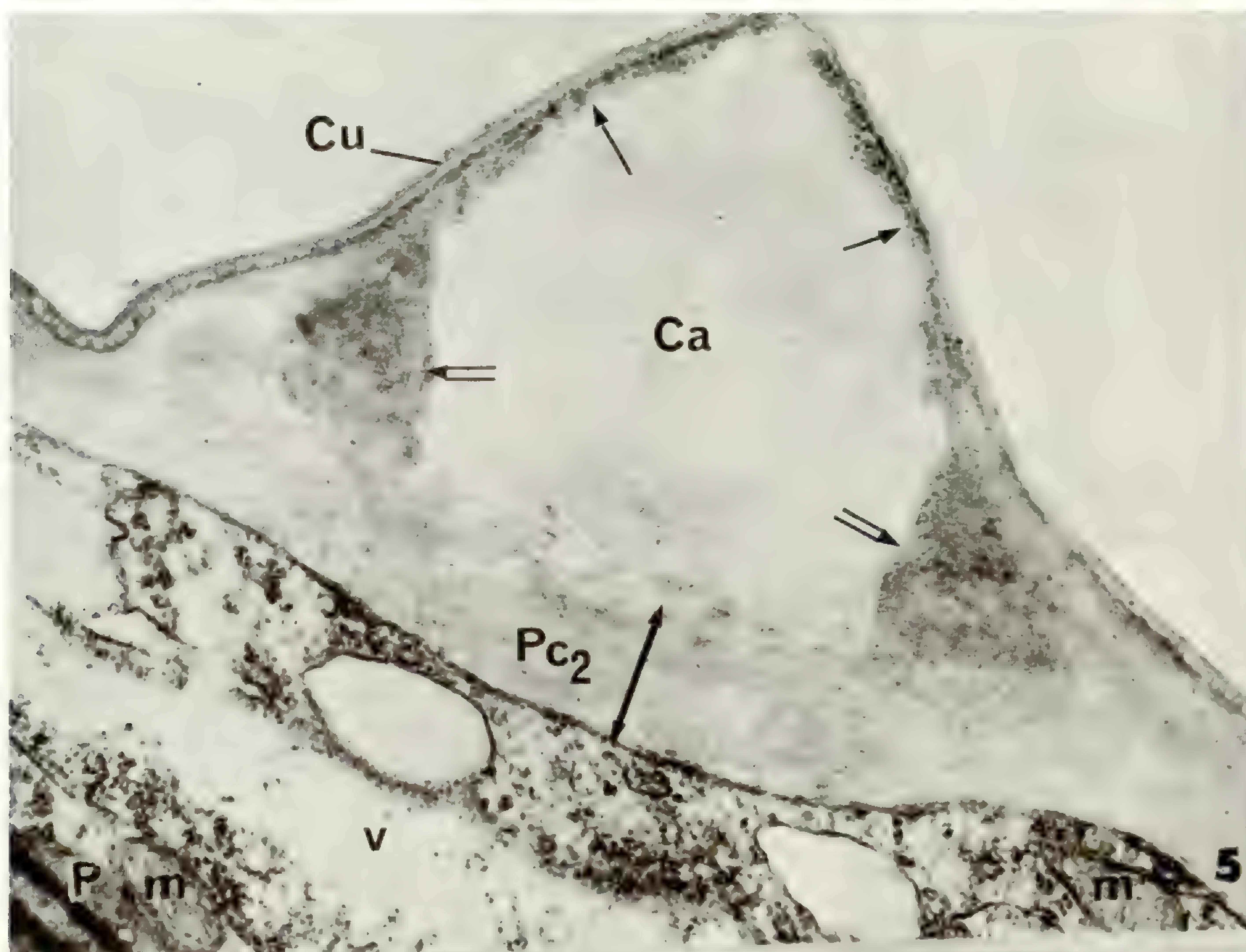
PLANCHE I

PLANCHE II

Fig. 5. — Aspect ultrastructural d'un idioblaste porteur d'une verrue en fin de sécrétion polysaccharidique.

Sous la lentille callosique (Ca), bien reconnaissable par sa faible opacité aux électrons, est disposée une nouvelle formation de paroi (Pc_2). Remarquer qu'un matériel relativement plus opaque ourle la lentille (flèches simples) et forme à sa base deux plages plus importantes (flèches doubles). La cuticule (Cu) conserve les mêmes caractères. Dans le cytoplasme, étroitement appliqué contre la paroi, on reconnaît des mitochondries (m) et des chloroplastes (P). Les précipités, toujours d'aspect fibrillaire mais devenus plus denses, occupent la totalité du contenu vacuolaire (v) (G × 22500).

Fig. 6. — Stade où la silice (Si) est caractérisable dans la paroi de la verrue. Sa localisation se superpose exactement à celle du matériel plus opaque décrit dans la fig. 5. Elle revêt un aspect granulaire. Dans la paroi, à la base de la lentille callosique (Ca) apparaît une légère striation. Dans la vacuole (v), les précipités (Pf), dont l'importance n'a cessé de croître, sont désormais localisés contre la portion du tonoplaste (flèche) orientée vers l'extérieur (G × 19500).



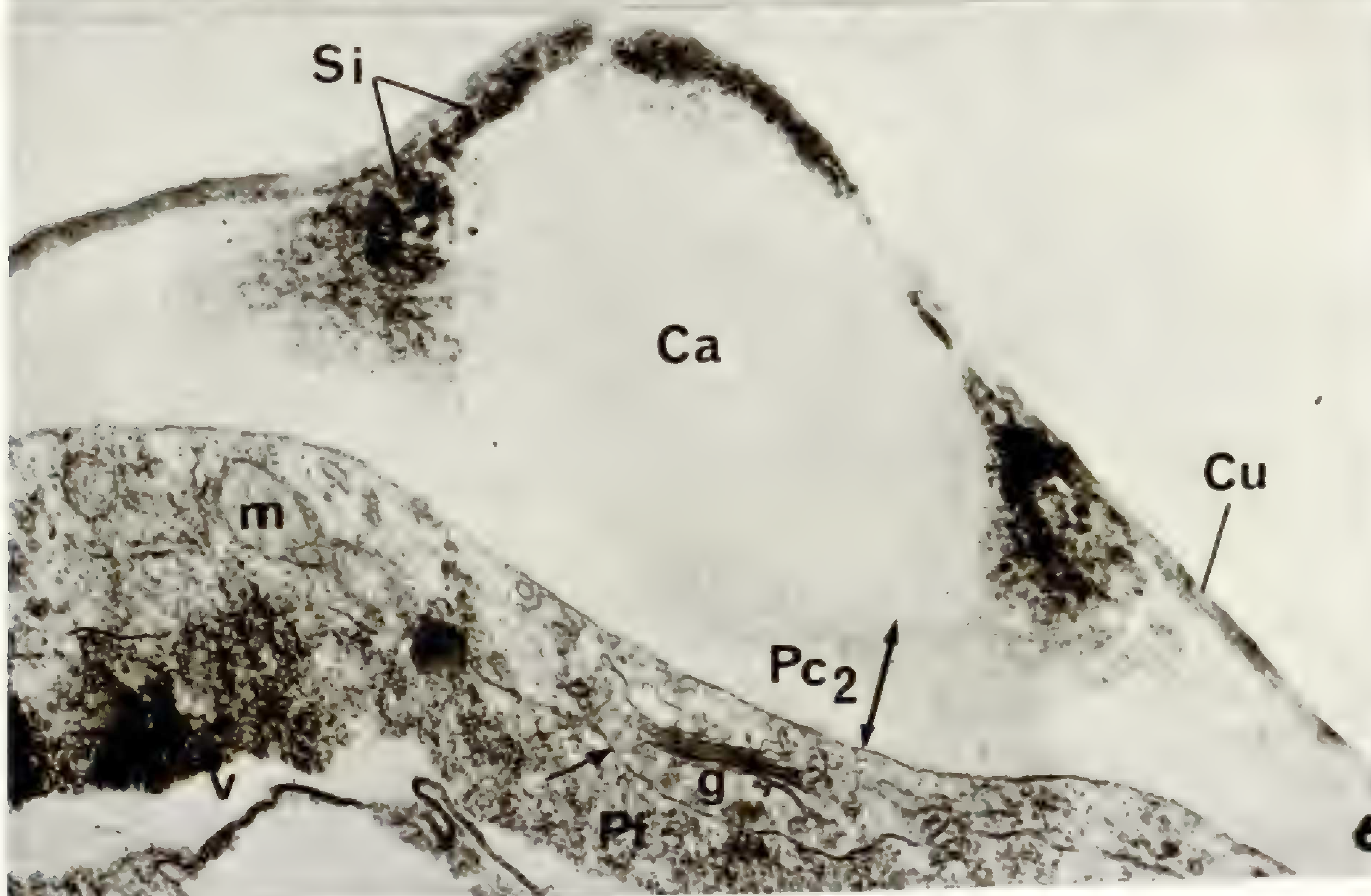
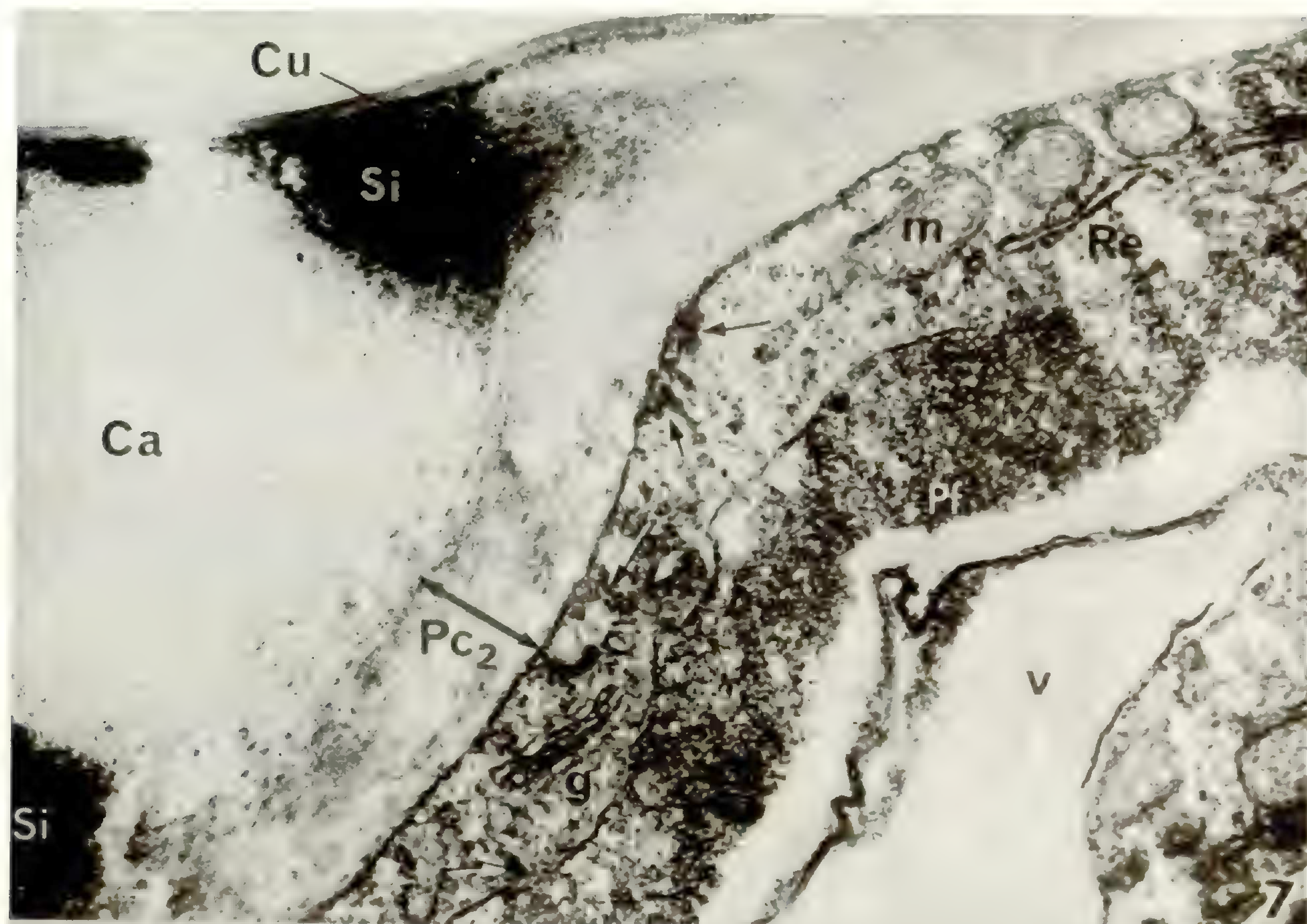


PLANCHE II

PLANCHE III

Fig. 7. — Les faits présentés sur la photographie précédente (fig. 6) sont nettement plus accusés. La striation de la paroi devient bien visible et la silice (Si), plus dense, est en quantité plus importante. Dans la vacuole (v) les précipités (Pf), hormis leur densité légèrement accrue, ont conservé les caractères précédents. Dans le cytoplasme, il faut noter la présence de concentrations locales de granules opaques aux électrons (flèches) qui pourraient correspondre à une forme de migration de la silice de la vacuole à la paroi (G × 24000).

Fig. 8. — Coupe d'une verrue chez un échantillon fixé par le seul glutaraldéhyde. Deux faits sont mis en évidence sur ce cliché : le matériel opaque aux électrons correspond bien à la silice ; la minéralisation, précédemment localisée à la périphérie de la verrue, gagne la partie centrale par substitution de la silice à la callose (G × 13000).



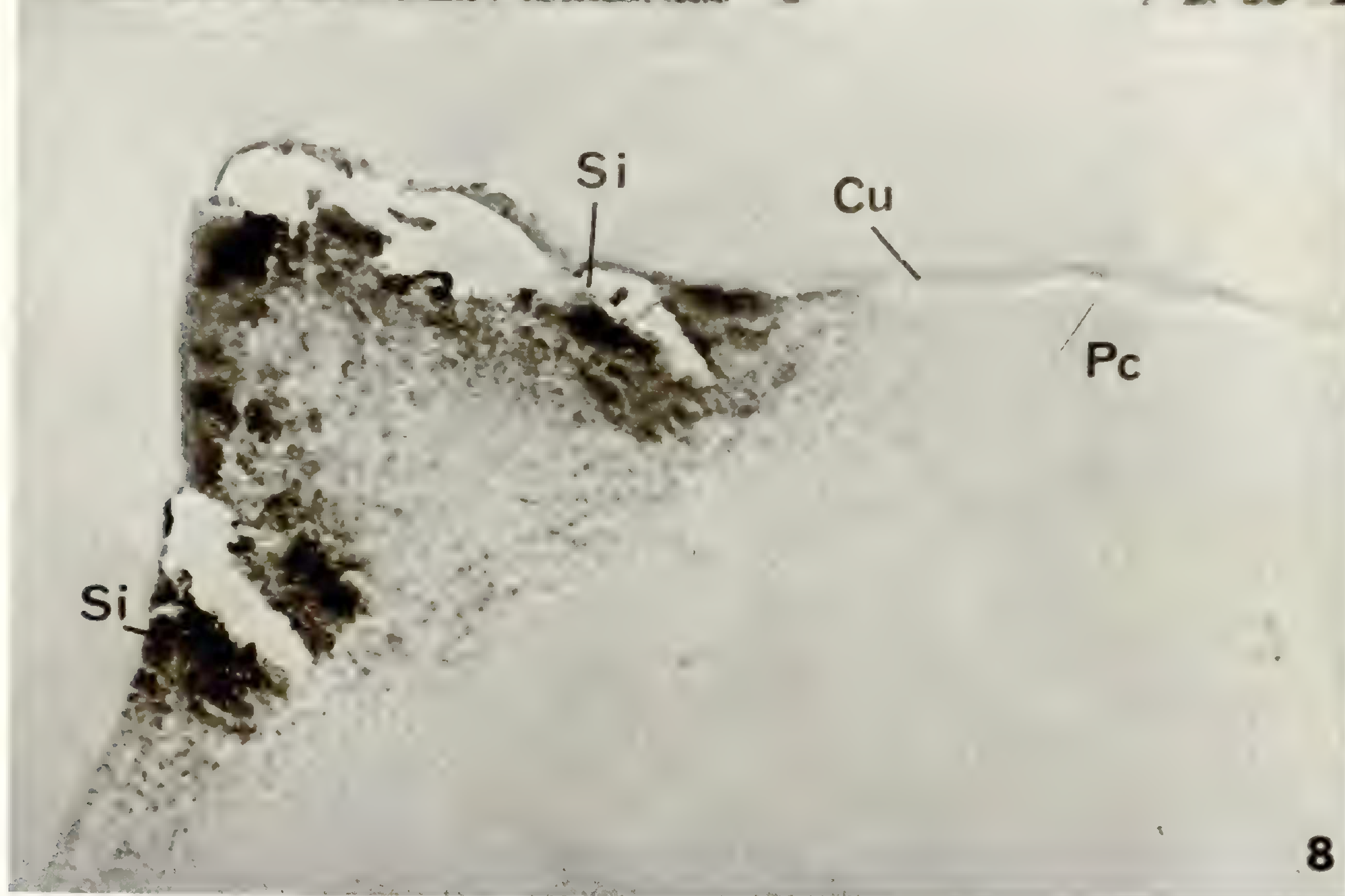
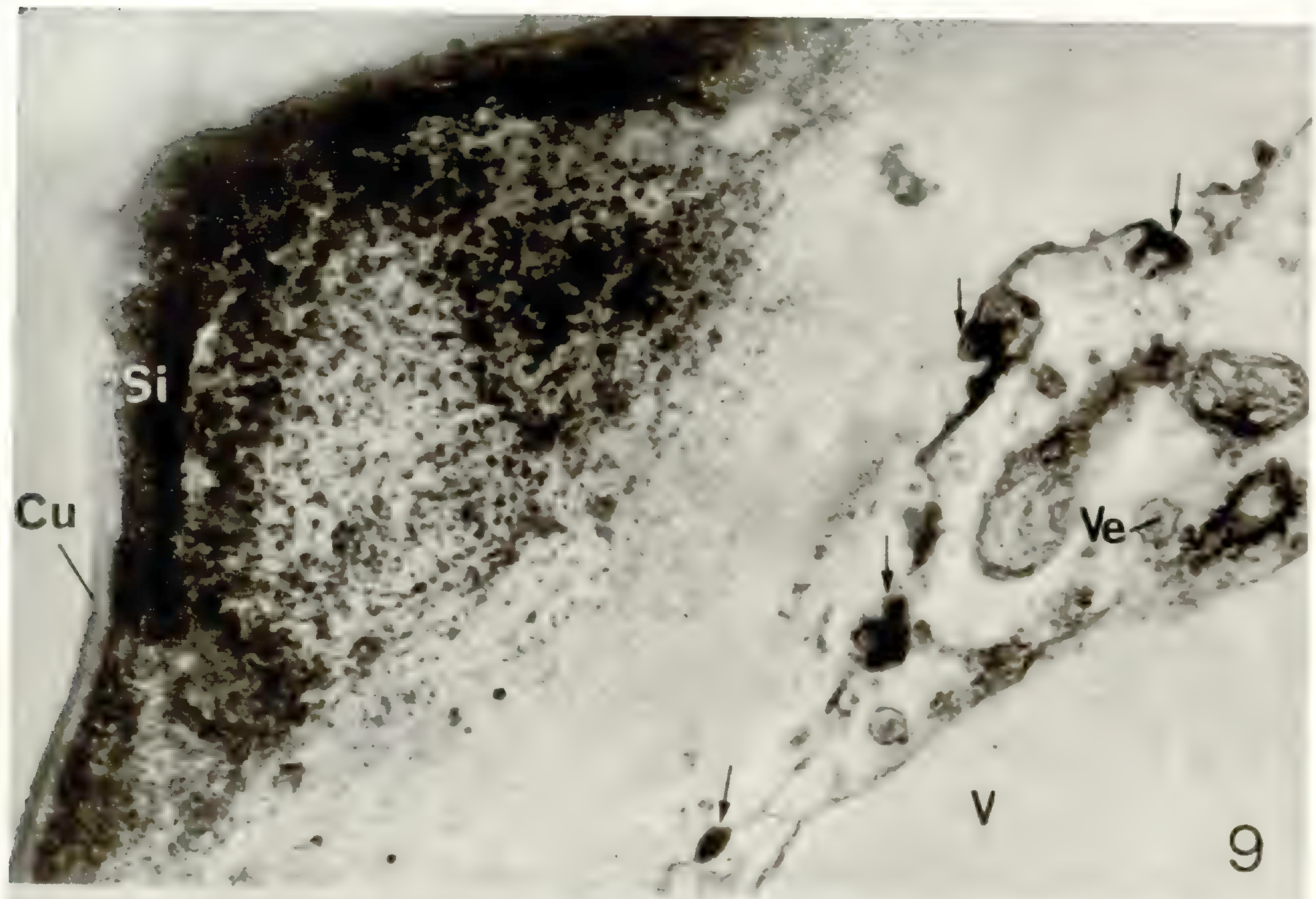


PLANCHE III

PLANCHE IV

Fig. 9 et 10. — Deux stades successifs de la fin de la minéralisation de la verrue ; ils montrent l'encroûtement minéral et simultanément la disparition complète du matériel callosique.

On ne trouve plus trace de précipités dans la vacuole (v) ; par contre, au niveau du plasmalemme (fig. 9, flèches) ou dans le cytoplasme (fig. 10, flèches), on observe des plages homogènes très opaques aux électrons. Au sein du hyaloplasme, à nouveau légèrement rétracté, on trouve de nombreuses vésicules (Ve) (fig. 9, G × 32000 ; fig. 10, G × 19000).



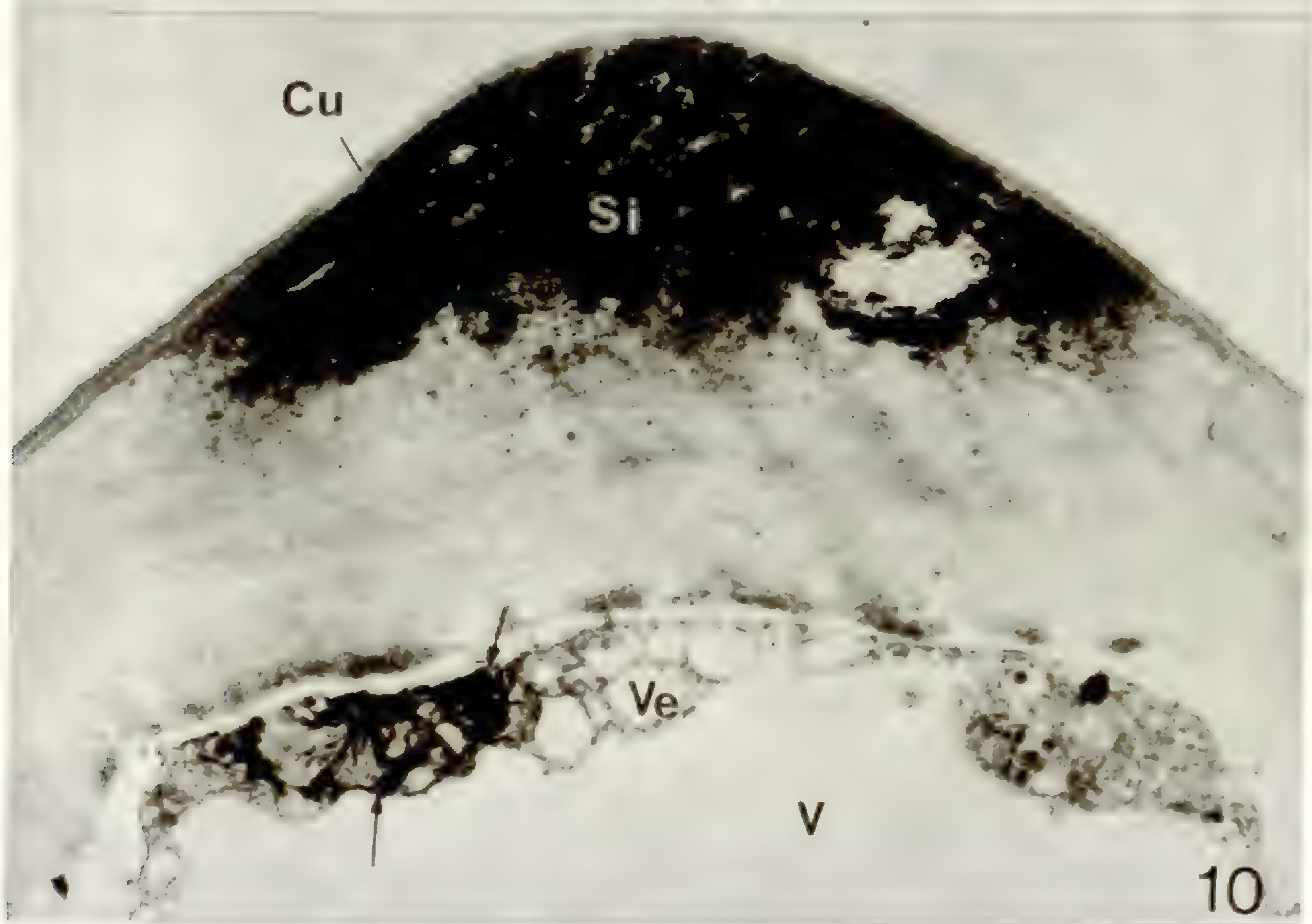


PLANCHE IV

PLANCHE V

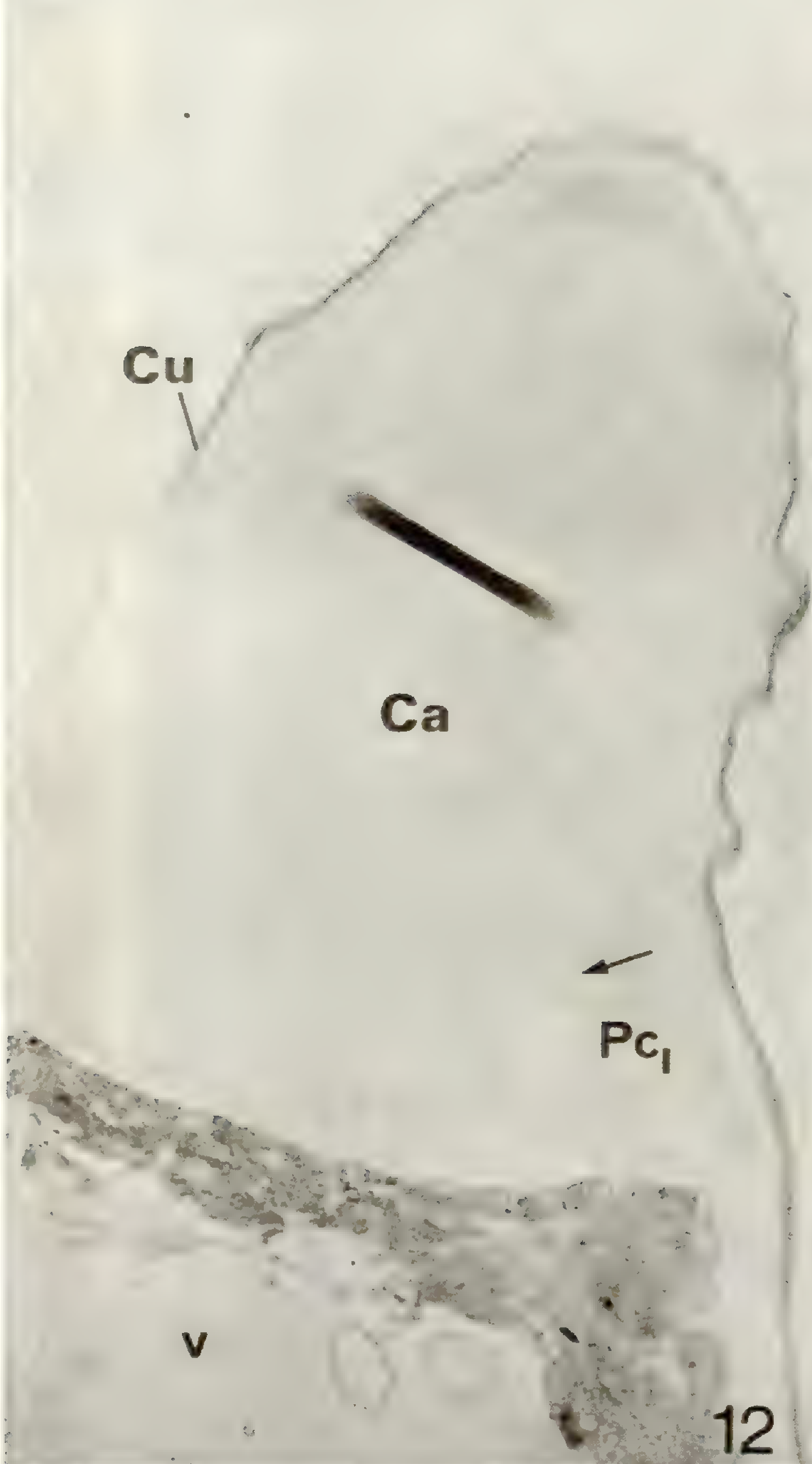
Fig. 11. — Coupe longitudinale d'une cellule porteuse d'un mucron en cours de silicification. On y reconnaît un cytoplasme riche en organites (g, m) limitant une très grande vacuole (v) axiale où se trouvent des précipités (Pf). Dans la paroi externe de la cellule (Pce), celle à proximité du mucron, les premiers précipités de silice s'accumulent sous la cuticule. (La flèche précise la disposition du limbe ; G × 10500.)

Fig. 12. — Coupe longitudinale d'un mucron callosique en cours d'édification. Remarquer son rétrécissement à la base (flèche) dû à un épaississement de la paroi cellulosique (Pc). La barre noire visible au milieu du mucron correspond à un tassement du matériel lors de la confection des coupes (G × 20000).

Fig. 13. — Coupe longitudinale d'une dent complète à un stade plus avancé que celui de la fig. 12. Le mucron terminal qui nous intéresse ici est constitué de callose (Ca) ; cette substance est limitée, tant en périphérie, au contact direct avec la cuticule, qu'à la base, par un matériel plus opaque aux électrons (flèches) : la silice. Ce stade de minéralisation de la dent est comparable à celui d'une verrue illustré sur la fig. 7(G × 9500).

Fig. 14. — Partie externe d'une cellule épidermique de la face adaxiale en cours de minéralisation. On y suit une concentration minérale croissante de l'intérieur vers la périphérie (flèche) avec un maximum de dépôt (Si) au contact de la cuticule (Cu). On constate en outre que toute la surface est affectée de façon rigoureusement uniforme. Dans la vacuole (V), aucun précipité n'est perceptible (G × 23000).





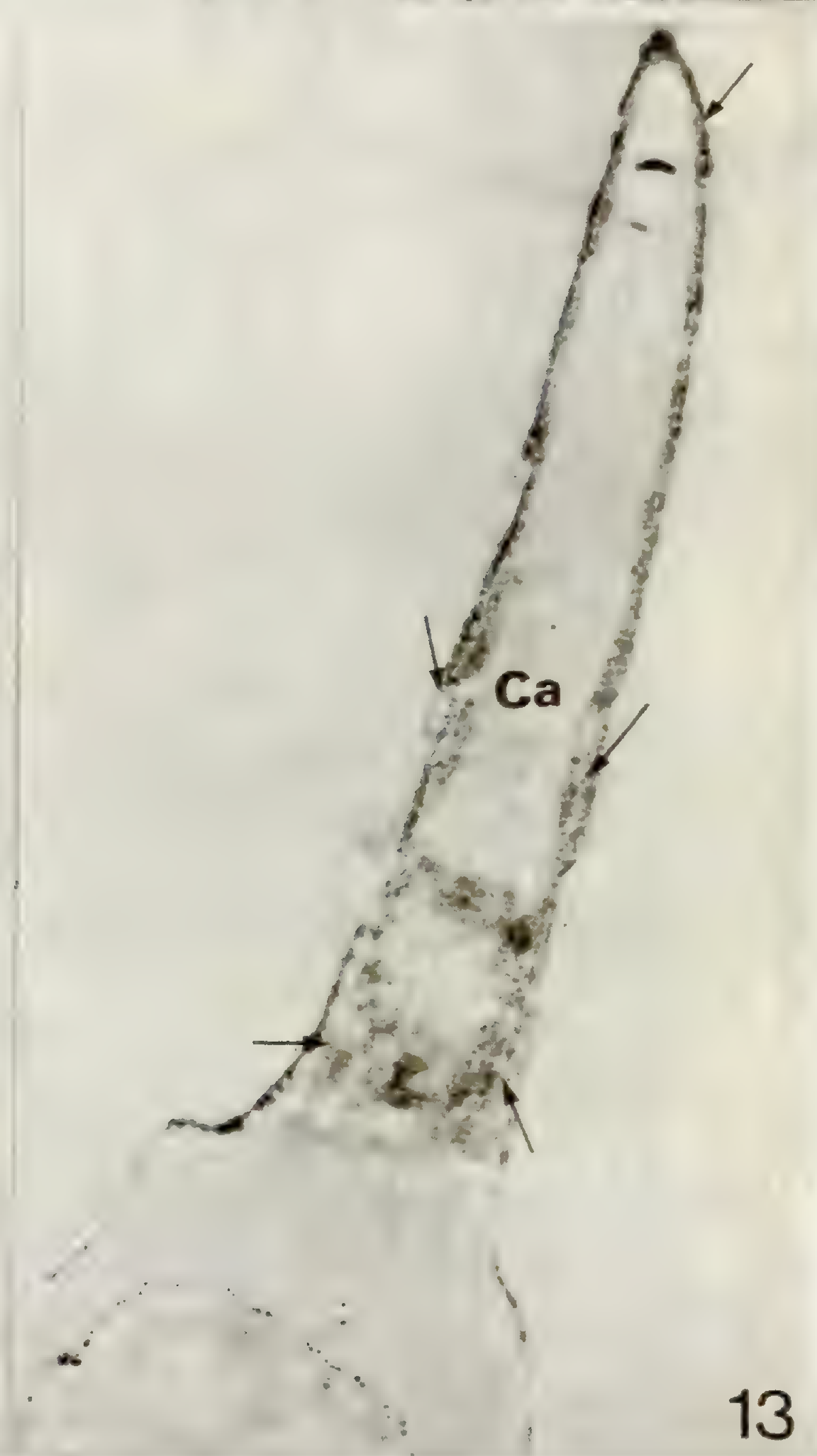


PLANCHE V

PLANCHE VI

Fig. 15. — Aspect d'une verrue après la seconde phase de minéralisation. La silice très dense à son niveau, déposée lors de la première phase, a été partiellement arrachée lors de la confection des coupes (flèches). En position plus interne se trouve la couche continue (C_2) correspondant à la seconde phase de silicification. Son aspect ajouré est imputable à la dureté moindre du second dépôt. A un tel stade âgé, le cytoplasme des cellules ne montre aucun signe évident de dégénérescence (G × 10000).

Fig. 16. — Paroi externe d'une cellule épidermique de la face adaxiale dans la région médiane totalement encroûtée par le silicium. On y relève un dépôt d'épaisseur sensiblement constante sauf dans la zone d'affrontement de deux cellules (flèche simple). L'identité d'aspect des mamelons (flèche double) et de la cuticule (Cu) est ici particulièrement nette (G × 16000).

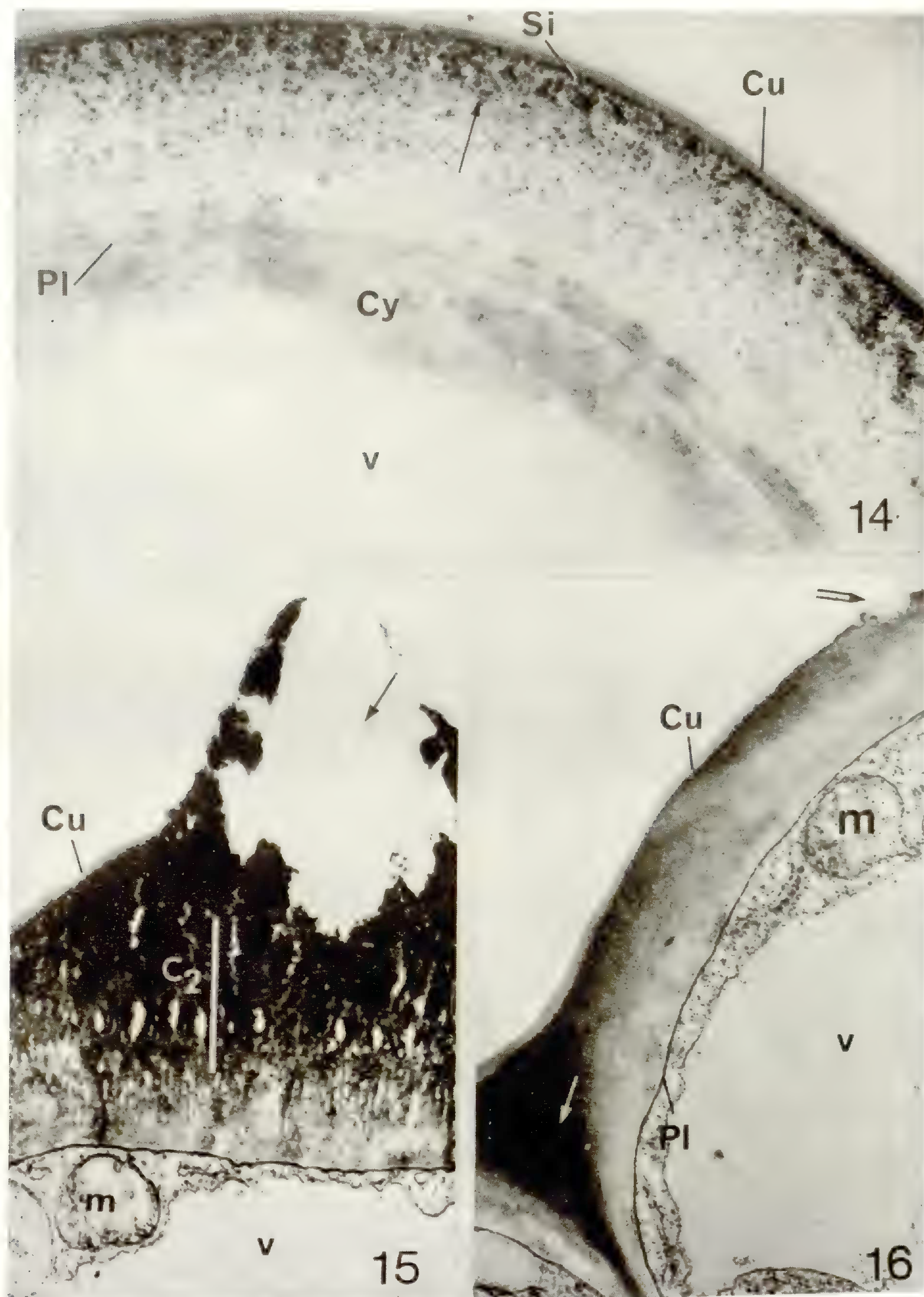


PLANCHE VI

PLANCHE VII

Fig. 17 et 19. — Coupes longitudinales (fig. 17) et tranversale (fig. 19) effectuées vers le sommet de cellules porteuses d'un mucron siliceux. Dans les deux cas, l'inégalité de distribution de la silice (Si) est remarquable. Au sein du cytoplasme devenu vésiculeux (Ve) certaines mitochondries (m') présentent des signes de dégénérescence alors que d'autres (m) semblent tout à fait normales. La cuticule (Cu), en dépit de l'importance de la minéralisation, conserve son intégrité. Les flèches indiquent la position du limbe foliaire par rapport à la dent (fig. 17, G × 17500 ; fig. 19, G × 8500).

Fig. 18 et 20. — Coupe transversale d'une feuille dans la région médiane du limbe (fig. 20). La face interne (In) se distingue de l'autre (Ex) par la présence en surface de petits mamelons (flèches). A plus fort grossissement (fig. 18), on se rend compte que c'est à un dépôt de substance d'opacité très comparable à celle de la cuticule qu'est dû l'aspect mamelonné ; à son niveau la couche dense (flèche) qui limite la cuticule vers la base dessine un réseau complexe (flèche double) (fig. 18, G × 56000 ; fig. 20, G × 4000).